昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, September 2011, 54(9): 1076－1081　　ISSN 0454-6296

枣花病对意大利蜜蜂消化酶和解毒酶系活性的影响

马卫华，申晋山，郭　媛，张云毅，邵有全*

（山西省农业科学院园艺研究所，太原 030031）

摘要：【目的】枣花期蜜蜂易发生枣花中毒(又称枣花病)，致使大量采集蜂死亡。本研究初步探讨了枣花病对蜜蜂的毒性作用机理。【方法】以正常的意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 工蜂为对照，采用分光光度法测定山西临猗、太谷和临县患枣花病的意大利蜜蜂工蜂体内淀粉酶、蛋白酶、蔗糖酶、果胶酶、海藻糖酶、酯酶(esterase，EST)、谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase，GST)、细胞色素 P450(cytochrome P450)和乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase，AchE)的活性。【结果】临猗、太谷和临县意蜂的淀粉酶活性分别为对照的73.17%，60.74%和70.50%；蛋白酶活性分别为对照的74.45%，50.68%和90.44%；果胶酶活性分别为对照的39.50%，27.99%和73.13%；而蔗糖酶和海藻糖酶活性与对照比较没有显著差异($P>0.05$)。GST 活性分别为对照的1.29，1.47和1.30倍；P450 活性分别为对照的3.31，1.66和2.12倍；而 EST 和 AchE 活性与对照相比没有显著差异($P>0.05$)。【结论】枣花期蜜蜂采食枣花蜜使其体内淀粉酶、蛋白酶和果胶酶等消化酶活性和解毒酶系的活性发生变化，这可能与枣花病的发生有关。

关键词：意大利蜜蜂；枣花病；消化酶；解毒酶；酶活性

中图分类号：Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2011)09-1076-06

Effects of Zaohua disease on activities of digestive enzymes and detoxification enzymes in *Apis mellifera ligustica*

MA Wei-Hua, SHEN Jin-Shan, GUO Yuan, ZHANG Yun-Yi, SHAO You-Quan* (Horticulture Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China)

Abstract: In order to explore the mechanism of honeybee's Zaohua disease caused by date nectar and pollen, worker honeybees of *Apis mellifera ligustica* suffered the disease were collected from Linyi, Taigu and Linxian, and the activities of amylase, protease, invertase, pectinase, trehalase, esterase (EST), glutathione-S-transferase (GST), cytochrome P450 (P450), acetylcholinesterase (AchE) were determined by spectrophotometry. The results showed that compared with the control (enzyme activity of the normal worker honeybee), the amylase activities of worker honeybees from Linyi, Taigu and Linxian were decreased by 73.17%, 60.74% and 70.50%, respectively; protease activities were decreased by 74.45%, 50.68% and 90.44%, respectively; and pectinase activities were decreased by 39.50%, 27.99% and 73.13%, respectively. However, sucrase and trehalase activities had no significant difference from those of the control ($P>0.05$). GST activities of worker honeybees from Linyi, Taigu and Linxian were enhanced by 1.29-, 1.47- and 1.30-fold, and P450 activities were enhanced by 3.31-, 1.66- and 2.12-fold, respectively. But EST and AchE activities had no significant difference from those of the control ($P>0.05$). The activities of digestive and detoxification enzymes of worker honeybees, including amylase, protease and pectinase, are changed after their feeding on date nectar and pollen during date florescence, which may be related to the occurrence of Zaohua disease.

Key words: *Apis mellifera ligustica*; Zaohua disease; digestive enzymes; detoxification enzymes; enzyme activity

枣花期蜜蜂易发生枣花中毒(又称枣花病)，致使大量采集蜂死亡，蜂群群势下降，对蜂群非常不利，不仅严重影响枣花期蜂蜜和王浆的产量，而且影响蜜蜂对枣树授粉。关于枣花病的病因，20 世

基金项目：现代农业蜂产业技术体系建设专项资金(CARS-45-KXJ5)；山西省科技攻关项目(20100311020)

作者简介：马卫华，女，硕士研究生，助理研究员，主要从事蜜蜂学和蜜蜂授粉研究，E-mail：mwhuachina@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: shaoyouquan@163.com

收稿日期 Received: 2011-01-11；接受日期 Accepted: 2011-07-13

纪 50 年代研究认为主要因气候干旱、蜜汁浓稠以及工蜂劳动量过大等引起。20 世纪 60 年代初，中国农业科学院养蜂研究所夕良(1960)对蜜蜂枣花病的病因及防治进行了阶段性的研究，认为枣花病可能与枣花蜜浓度高、天气和工蜂出勤有关。20 世纪 90 年代李晓立和范正友(1991)对枣花病病因进行了探讨并提出，蜜蜂枣花病的发生与枣花蜜中钾离子含量显著相关。王国旺(2010)提出用大黄加少量糖水和柠檬酸防治枣花病。虽然这些学者对枣花病的病因及防治做了大量工作，但枣花病对蜜蜂的作用机理不清楚。关于蜜蜂消化酶和解毒酶的研究，多集中于杀虫剂和转基因作物对蜜蜂的影响上(Westlake *et al*., 1985; Pham-Delègue *et al*., 2000; Claudianos *et al*., 2006; 田岩等, 2006; Konrad *et al*., 2009; Zhou *et al*., 2011)，其中杨冠煌等(2006)研究了氟胺氰菊酯对西方蜜蜂 *Apis mellifera* L. 寄生虫雅氏瓦螨的解毒酶活性的影响。对蜜蜂采集枣花蜜后体内消化酶和解毒酶系的研究尚未见报道。本研究从酶代谢的角度对枣花期蜜蜂消化酶和解毒酶活性进行测定和分析，以期为探讨蜜蜂枣花病对蜜蜂的作用机理以及枣花病的防治提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试蜜蜂

供试蜜蜂：采集枣花蜜以后在蜂巢前爬行的意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica*（以下简称“意蜂”）成年工蜂，于枣花期(2010 年 6 月中旬 –7 月中旬)取自山西临猗县、临县和太谷县养蜂场；以同期采自太原市小店区(周围无枣树)养蜂场的成年意蜂工蜂作为对照(CK)。用纱笼把样本迅速带回实验室，保存于 –80℃冰箱备用。

1.2　试剂

α-萘酚、固蓝 B-SDS、ATC、DTNB、对硝基苯甲醚(*p*-NA)、NADPH、1-氯-2，4-二硝基苯(CDNB)和还原型谷胱甘肽(GSH)订购于美国 Sigma 化学药品公司；淀粉酶、蔗糖酶和蛋白测试试剂盒购自南京建成生物工程研究所；其他化学试剂均为国产分析纯。

1.3　酶液的制备

分别取 CK 和 3 个试验点各 10 头整虫放入玻璃匀浆器中，按 1∶10(w/v)的比例加入 0.1 mol/L pH 7.0 Tris-HCl 缓冲液，在冰浴中用电动匀浆机 800 r/min 匀浆 5 min，将匀浆液于 4℃15 000 × g 离心 20 min，取上清液作为酶提取液。每 10 头虫为一个重复，3 次重复。

1.4　意蜂体内消化酶活性的测定

蛋白酶活性、果胶酶活性及海藻糖酶活性的测定分别按照龚舒聪等(2008)、王小敏等(2007)及雷芳等(2006)的测定方法进行测定。淀粉酶、蔗糖酶活性和蛋白测定采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒。

1.5　意蜂体内代谢解毒酶活性的测定

酯酶(EST)、谷胱甘肽-*S*-转移酶(GST)和乙酰胆碱酯酶(AchE)活性测定均按照梁革梅等(2001)进行，细胞色素 P450(P450)活性测定按照 Anderson 和 Zhu(2004)的测定方法进行。

1.6　蛋白质含量测定

采用 BCA 法(Smith *et al*., 1985)对上述酶液进行总蛋白含量的测定。

1.7　数据统计与分析

实验结果以平均值 ± 标准差(mean ± *SD*)表示。数据的统计采用 SPSS 11.5 软件的 Means 和 one-way ANOVA 中的 LSD 和 Duncan 氏多重比较来进行分析，并进行显著性检验。

2　结果与分析

2.1　意蜂体内的消化酶活性

临猗、太谷和临县 3 个试验点意蜂体内的消化酶活性见图 1。从图 1(A)可以看出临猗、太谷和临县 3 个试验点意蜂的淀粉酶活性均低于 CK(太原)，分别为对照的 73.17%，60.74% 和 70.50%，差异显著($P < 0.05$)，表明淀粉酶活性下降。3 个试验点之间，太谷的意蜂淀粉酶活性最低，与其他 2 个试验点意蜂的淀粉酶活性有显著差异($P < 0.05$)，临猗和临县的意蜂淀粉酶活性没有显著差异($P > 0.05$)。

意蜂的蛋白酶活性见图 1(B)。可看出临猗、太谷和临县出 3 个试验点意蜂的蛋白酶活性均低于 CK，分别为对照的 74.45%，50.68% 和 90.44%，有显著差异($P < 0.05$)，说明意蜂的蛋白酶活性下降。3 个试验点之间，太谷意蜂的蛋白酶活性最低，3 个试验点之间意蜂的蛋白酶活性有显著差异($P < 0.05$)。

意蜂的蔗糖酶活性见图 1(C)。可以看出临猗、太谷和临县 3 个试验点意蜂蔗糖酶活性均低于 CK，

且临猗和太谷意蜂的蔗糖酶活性与 CK 差异显著($P<0.05$)，但临县意蜂的蔗糖酶活性与 CK 没有显著差异。3 个试验点之间，临县意蜂蔗糖酶活性最高，与其他 2 个试验点有显著差异($P<0.05$)，临猗和太谷之间意蜂的蔗糖酶活性没有显著差异($P>0.05$)。

意蜂的果胶酶活性见图 1(D)。由图 1(D)可以看出临猗、太谷和临县 3 个试验点意蜂果胶酶活性均低于 CK，分别为对照的 39.50%，27.99% 和 73.13%，差异显著($P<0.05$)，说明意蜂果胶酶活性下降。3 个试验点之间，太谷意蜂的果胶酶活性最低，3 个试验点之间意蜂的果胶酶活性有显著差异($P<0.05$)。

意蜂的海藻糖酶活性见图 1(E)。由图 1(E)可以看出 3 个试验点意蜂海藻糖酶活性均低于 CK，但没有显著差异($P>0.05$)。3 个试验点之间意蜂的海藻糖酶活性也没有显著差异($P>0.05$)。

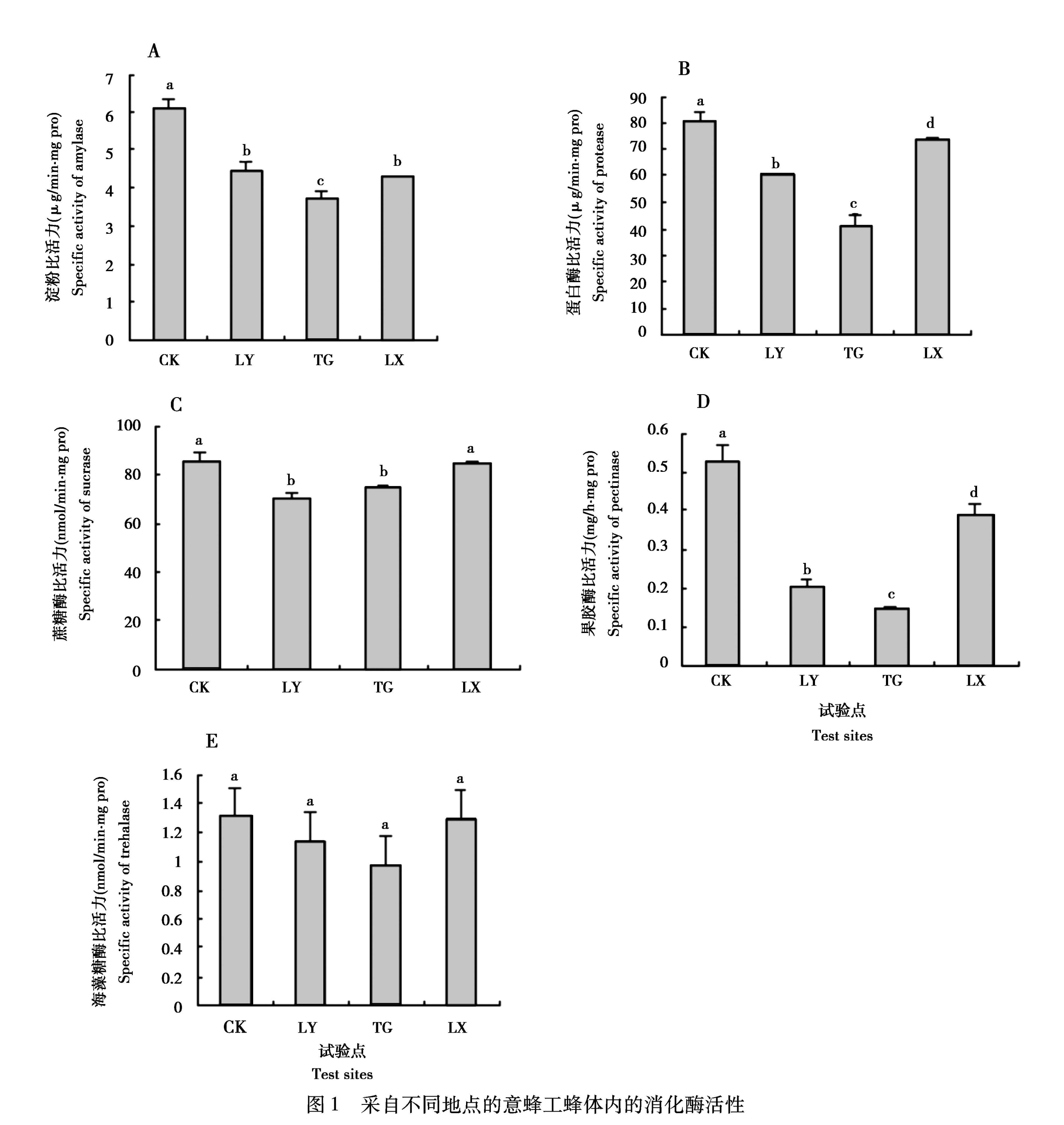


图 1 采自不同地点的意蜂工蜂体内的消化酶活性

Fig. 1 Activities of digestive enzymes in *Apis mellifera ligustica* workers honeybee collected from different test sites

A：淀粉酶 Amylase；B：蛋白酶 Protease；C：蔗糖酶 Sucrase；D：果胶酶 Pectinase；E：海藻糖酶 Trehalase. CK：太原 Taiyuan；LX：临县 Linxian；LY：临猗 Linyi；TG：太谷 Taigu. 柱上不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。Different letters above bars indicate significant difference at the 0.05 level.

2.2　意蜂体内的解毒酶活性

用α-乙酸萘酯为底物测定酯酶活性，结果见图2(A)。从图2(A)可看出3个试验点意蜂酯酶活性均高于CK(太原)，但没有显著差异($P>0.05$)。3个试验点之间意蜂酯酶活性也没有显著差异($P>0.05$)。

用CDNB为底物测定GST活性，结果见图2(B)。由图2(B)可看出临猗、太谷和临县3个试验点GST活性均高于CK，分别为对照的1.29，1.47和1.30倍，有显著差异($P<0.05$)，说明GST酶活性增高。3个试验点之间意蜂的GST活性没有显著差异($P>0.05$)。

从图2(C)可看出临猗、太谷和临县3个试验点意蜂的P450活性均高于CK，分别为对照的3.31，1.66和2.12倍，且差异显著($P<0.05$)，说明意蜂的P450活性增高。从3个试验点看，临猗意蜂的P450活性最高，与其他2个试验点有显著差异($P<0.05$)，太谷和临县之间意蜂的P450没有显著差异($P>0.05$)。

从图2(D)可看出3个试验点意蜂的AchE活性均高于CK，但与3个试验点没有显著差异($P>0.05$)。3个试验点之间意蜂的AchE活性也没有显著差异($P>0.05$)。

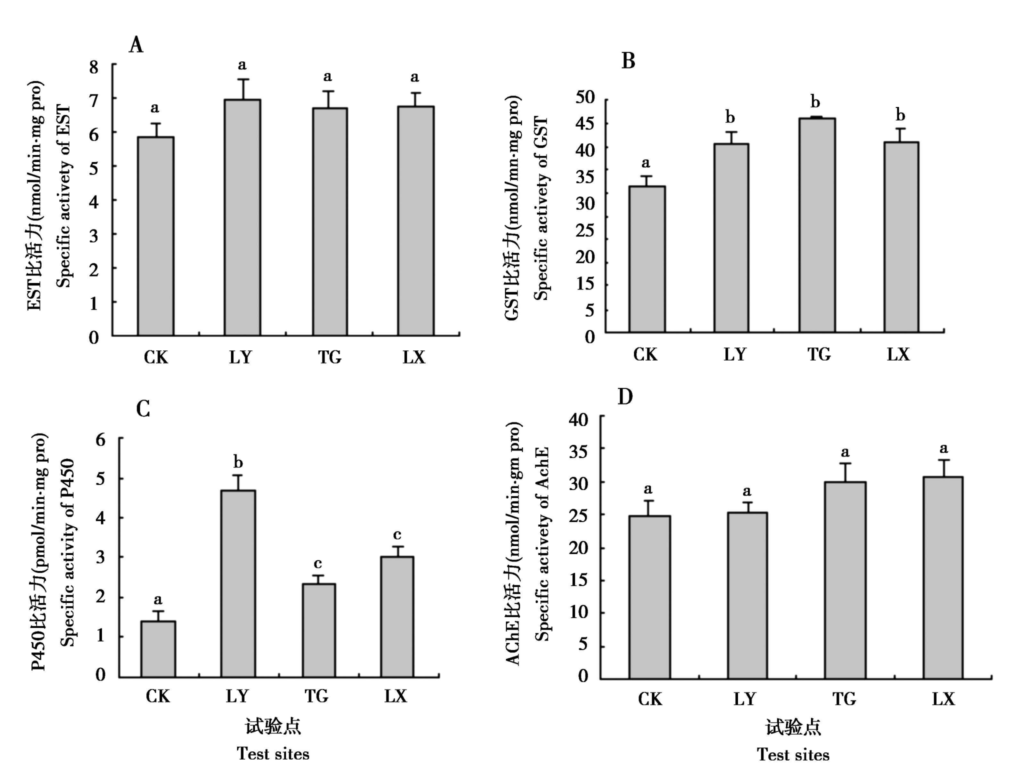


图2　采自不同地点的意蜂工蜂体内的解毒酶活性

Fig. 2　Activities of detoxification enzymes in *Apis mellifera ligustica* workers collected from different test sites

A：酯酶EST；B：谷胱甘肽硫转移酶GST；C：细胞色素P450 P450；D：乙酰胆碱酯酶AchE. CK：太原Taiyuan；LX：临县Linxian；LY：临猗Linyi；TG：太谷Taigu. 柱上不同字母表示在0.05水平上差异显著。Different letters above bars indicate significant difference at the 0.05 level.

3　讨论

枣花泌蜜期易发生枣花病，使大量采集蜂死亡，严重影响枣花期蜜蜂的采集。针对目前多数认为蜜蜂枣花期中毒原因，是由花粉中生物碱和花蜜中游离钾离子浓度引起的(夕艮，1960；李晓立和范正友，1991；金丰，1994)，但在前期研究中发现，3个试验点的钾离子浓度平均值分别为0.133，0.101和0.129 μg/g，没有显著差异。本文从酶代谢的角度对枣花期蜜蜂消化酶和解毒酶活性进行研究，结果表明：3个试验点蜜蜂的淀粉酶、蛋白酶、蔗糖酶、果胶酶和海藻糖酶5种消化酶活性都低于CK，且淀粉酶、蛋白酶和果胶酶与对照有显著差异，表明枣花病的发生影响蜜蜂消化系统的酶类代谢。3个试验点之间蜜蜂的消化酶活性来看，三者

之间也有差异，这与不同地点枣花病的发生严重程度不同的说法一致(金丰，1994)。3 个试验点蜜蜂的酯酶、谷胱甘肽-S-转移酶、细胞色素 P450、乙酰胆碱酯酶的酶活性都高于 CK，且谷胱甘肽-S-转移酶、细胞色素 P450 与对照有显著差异，表明枣花病的发生使解毒酶系发生变化。

蜜蜂消化酶活性的高低影响蜜蜂营养吸收的好坏和正常的生理过程。转基因作物会对蜜蜂体内消化酶活性产生影响(Pham-Delègue *et al*., 2000；田岩等，2006；Konrad *et al*., 2009)，说明取食不同植物会引起蜜蜂体内消化酶的活性变化。本试验的结果表明枣花病使蜜蜂的淀粉酶、蛋白酶和果胶酶活性受到抑制，影响蜜蜂对淀粉、蛋白和树胶的消化，从而影响其正常吸收和排泄。

EST，P450，GST 和 AchE 均为昆虫体内重要的解毒代谢酶系。EST 作为水解酶，其活性的提高在昆虫对有机磷杀虫剂抗性积累中起着重要的作用。细胞色素 P450 参与内源性物质和包括药物、环境化合物在内的外源性物质的代谢。GST 参与昆虫体内内源及外源性物质的代谢,在寄主适应性及抗药性形成中起着重要作用。AChE 能够迅速水解兴奋性神经递质乙酰胆碱而保持神经突触的正常传递，是有机磷杀虫剂的作用靶标。许多学者研究了这些解毒酶系在杀虫剂和植物次生物质代谢中的重要作用(张彦广等，2001；侯军等，2007；周琳等，2008；马燕等，2010)。而且一些学者还研究了杀虫剂对蜜蜂解毒酶的影响，表明杀虫剂和环境因素会造成蜜蜂解毒酶系的变化(Westlake *et al*., 1985；Claudianos *et al*.,2006；Johnson *et al*.,2006)。本研究中 3 个试验点蜜蜂体内的酯酶和乙酰胆碱酯酶与对照没有显著差异，表明枣花期蜜蜂体内酯酶和乙酰胆碱酯酶没有受到枣花病的诱导而激活。而 3 个试验点蜜蜂体内的 P450、GST 与对照有显著差异，表明枣花病诱导蜜蜂体内 P450 和 GST 活性增高，这可能是昆虫的一种应激性反应，以起到解毒的作用。

3 个试验点之间消化酶和解毒酶活性的变化可能与当地的气候、土壤、水源等有关，这也是枣花病复杂的原因之一，因此有必要进行更深入地研究。

综上所述，枣花期蜜蜂体内的消化酶和解毒酶活性发生变化，表明枣花病影响了蜜蜂体内正常的生理生化过程，以致爬蜂或死亡。由于昆虫取食对象对虫体生理代谢的影响是多方面或综合性的，因此有必要对蜜蜂枣花病的作用机理进一步深入研究。

参 考 文 献 (References)

Anderson TD, Zhu KY, 2004. Synergistic and antagonistic effects of atrazine on the toxicity of organophosphorodithioate and organophosphorothioate insecticides to *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Pestic. Biochem. Physiol*., 80: 54 – 64.

Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler MA, Berenbaum MR, Feyereisen R, Oakeshott JG, 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, 15(5): 615 – 636.

Gong SC, Sun YT, Sheng SJ, Zhang B, Lu XM, 2008. Effect of different density of Pebrine spore (*Nosema bombycis*) infect on protease activity in silkworm midgut and blood. *Bulletin of Sericulture*, 39(3): 11 – 14. [龚舒聪，孙远挺，盛思佳，章犇，鲁兴萌，2008. 家蚕微孢子虫感染家蚕对其中肠和血液蛋白酶活性影响. 蚕桑通报，39(3): 11 – 14]

Hou J, Ma ZQ, Feng JT, 2007. Bioactivity of podophyllotoxin against *Plutella xylostella* and its effect on metabolic enzymes. *Acta Entomologica Sinica*, 50(9): 895 – 899. [侯军，马志卿，冯俊涛，2007. 鬼臼毒素对小菜蛾的生物活性及对其几种代谢酶系的影响. 昆虫学报，50(9): 895 – 899]

Jin F, 1994. Prevention of bee poisoning in Chinese date florescence. *Apiculture of China*, (3): 22. [金丰，1994. 枣花期蜜蜂中毒的防治. 中国养蜂，(3): 22]

Johnson RM, Wen ZM, Schuler MA, Berenbaum MR, 2006. Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. *J. Econ. Entomol*., 99(4): 1046 – 1050.

Konrad R, Connor M, Ferry N, Gatehouse AMR, Babendreier D, 2009. Impact of transgenic oilseed rape expressing oryzacystatin-1 (OC-1) and of insecticidal proteins on longevity and digestive enzymes of the solitary bee *Osmia bicornis*. *Journal of Insect Physiology*, 55: 305 – 313.

Lei F, Zhang GF, Wang FH, Ma J, 2006. Effects of plant species switching on contents and dynamics of trehalose and trehalase activity of *Bemisia tabaci* B-biotype and *Trialeurodes vaporariorum*. *Scientia Agricultura Sinica*, 39(7): 1387 – 1394. [雷芳，张桂芬，万方浩，马骏，2006. 寄主转换对 B 型烟粉虱和温室粉虱海藻糖含量和海藻糖酶活性的影响. 中国农业科学，39(7): 1387 – 1394]

Li XL, Fan ZY, 1991. Study on cause of zaohua disease of honeybee. *Apiculture of China*, (2): 5 – 8. [李晓立，范正友，1991. 蜜蜂枣花病病因的探讨. 中国蜂业，(2): 5 – 8]

Liang GM, Tan WJ, Gou YY, 2001. Comparison of some detoxification enzyme and midgut protease activities between resistant and susceptible cotton bollworm population to Bt. *Acta Phytophylacica Sinica*, 28(2): 133 – 138. [梁革梅，谭维嘉，郭予元，2001. 棉铃虫 Bt 抗感种群间数种解毒酶和中肠蛋白酶活性的比较. 植

物保护学报，28(2)：133－138]

Ma Y，Liu RR，Ma ZQ，Zhang YL，2010. Effects of cantharidin on four metabolizing enzymes and PPO in *Mythimna separata*（Walker）（Lepidoptera：Noctuidae）. *Acta Entomologica Sinica*，53（8）：870－875.［马燕，刘瑞瑞，马志卿，张雅林，2010. 斑蝥素对粘虫几种代谢酶及多酚氧化酶的影响. 昆虫学报，53(8)：870－875］

Pham-Delègue MH，Girard C，Le Métayer M，Picard-Nizou AL，Hennequet C，Pons O，Jouanin L，2000. Long-term effects of soybean protease inhibitors on digestive enzymes，survival and learning abilities of honeybees. *Entomologia Experimentalis et Applicata*，95：21－29

Smith PK，Krohn RI，Hermanson GT，Mallia AK，Gartner FH，Provenzano MD，Fujimoto EK，Goeke NM，Olson BJ，Klenk DC，1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*，150：76－85

Tian Y，Zhang YJ，Wu KM，Zhao KJ，Peng YF，Guo YY，2006. Effects of transgenic Bt-*cry1Ac* cotton pollen on growth and development of *Apis mellifera*（Linnaeus）（Hymenoptera：Apidae）. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*，12（4）：464－467.［田岩，张永军，吴孔明，赵奎军，彭于发，郭予元，2006. 转 Bt-cry1Ac 棉花花粉对意大利蜜蜂生长发育的影响. 应用与环境生物学报，12(4)：464－467]

Wang GW，2010. The prevention of zaohua disease. *Journal of Bee*，(5)：24.［王国旺，2010. 枣花病的防治. 蜜蜂杂志，(5)：24]

Wang XM，Wu WL，Lu LF，Li WL，Qu LW，2007. Study on methods of pectinase activity by spectrophotometry. *Science and Technology of Food Industry*，5(28)：227－229.［王小敏，吴文龙，闾连飞，李维林，屈乐文，2007. 分光光度计法测定果胶酶活力的方法研究. 食品工业科技，5(28)：227－229]

Westlake GE，Hardy AR，Stevenson JH，1985. Effects of storage and pesticide treatment on honey bee brain acetyl cholinesterase activities. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*，34：668－675.

Xi G，1960. Discussion on zaohua disease. *China Beekeeping*，(6)：274－275.［夕艮，1960. 试谈枣花病. 中国养蜂，(6)：274－275]

Yang GH，Wu LM，Lin GL，2006. Preliminary research on mechanism of fluvalinate resistance in *Varroa jacobsoni*. *Chinese Bulletin of Entomology*，43(2)：204－205.［杨冠煌，吴黎明，林桂莲，2006. 雅氏瓦螨对氟胺氰菊酯的抗性机理初探. 昆虫知识，43(2)：204－205]

Zhang YG，Huang DZ，Wang ZG，Yan YH，Yin JF，2001. Effects of secondary metabolites of poplar trees on the carboxylesterase and glutathione-S-transferase in *Anoplophora glabripennis*. *Scientia Silvae Sinicae*，37(6)：123－128.［张彦广，黄大庄，王志刚，阎晔辉，尹家凤，2001. 杨树次生代谢物质对光肩星天牛羧酸酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶的影响. 林业科学，37(6)：123－128]

Zhou L，Ma ZQ，Feng JT，Zhang X，2008. Effects of total alkaloid from *Tripterygium wilfordii* Hook f. on the growth and development of *Mythimna separata*（Walker）（Lepidoptera：Noctuidae）and its metabolic enzymes. *Acta Entomologica Sinica*，51（11）：1151－1156.［周琳，马志卿，冯俊涛，张兴，2008. 雷公藤总生物碱对粘虫生长发育及几种代谢酶系的影响. 昆虫学报，51(11)：1151－1156]

Zhou T，Zhou W，Wang Q，Dai PL，Liu F，Zhang YL，Sun JH，2011. Effects of pyrethroids on neuronal excitability of adult honeybees *Apis mellifera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*，100：35－40.

（责任编辑：赵利辉）